

Departement Pferde der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich  
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Jörg A. Auer, MS, Dipl. ECVS/ACVS

---

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg,  
Dipl. ECVS  
Muskuloskeletal-Research-Unit ( MSRU )

## **Biokompatibilitätsstudie von Seiden-Scaffolds an Schafen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Vetsuisse – Fakultät  
Universität Zürich

vorgelegt von  
**Tanja Apfel**  
Tierärztin  
aus Coburg ( Deutschland )

Genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin  
PD Dr. Lorenz Meinel, Korreferent

Zürich 2008

*Meinen Großeltern*

*Sophie & Heinz*

# **Inhaltsverzeichnis**

Zusammenfassung	1
Summary	2
<b>1</b> Einleitung	3
1.1 Problemstellung	3
1.2 Zielsetzung der Arbeit	5
1.3 Versuchsanordnung	5
<b>2</b> Literaturübersicht	6
2.1 Schaf als Versuchstier	6
2.2 Bohrlochmodell	6
2.3 Knochenersatzmaterialien bzw. Biomaterialien	7
2.4 Seide als Knochenersatzmaterial	10
2.5 Biokompatibilität	11
2.6 Wundheilung und Fremdkörperreaktion	12
2.7 Zellen	13
<b>3</b> Material und Methoden	15
3.1 Aufbau der Studie	15
3.2 Tiermodell	15
3.3 Eingesetzte Materialien	15
3.4 Vorbereitung	16
3.5 Operation	17
3.5.1 Proximaler Humerus	19
3.5.2 Distaler Humerus	19
3.5.3 Proximaler Femur	19

3.5.4	Distaler Femur	20
3.6	Probenaufbereitung und –auswertung	21
3.6.1	Gewinnung und Aufbereitung der Proben	21
3.6.2	Untersuchungsmethoden	23
3.6.3	Probenauswertung	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Operation	24
4.2	Postoperative Phase	24
4.3	Beschaffenheit / Handhabung der Scaffolds	25
4.4	Makroskopische Auswertung	25
4.5	Mikroskopische Auswertung	25
5	Diskussion	28
5.1	Versuchsmodell	28
5.2	Probenaufbereitung und –auswertung	30
5.3	Ergebnisse	31
5.4	Perspektiven	34
6	Literaturverzeichnis	35
7	Anhang	39
7.1	Abbildungen	39
7.2	Tabellen	48

Danksagung

Lebenslauf

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden vier verschiedene Gruppen von Seiden-„Scaffolds“ (hierbei handelt es sich um dreidimensionale Leitstrukturen für wachsendes Gewebe) auf ihre Biokompatibilität als Knochenersatzmaterial untersucht. Diese Scaffolds unterschieden sich jeweils im Herstellungsprozess, sowie in der Herkunft der Seide. Der Herstellungsprozess unterschied sich vor allem im Gebrauch der Porogene und der Art diese aus den Scaffolds herauszulösen.

In acht verschiedenen Lokalisationen am Knochen wurde die Eignung des Materials in einem Bohrlochmodell bei Schafen evaluiert. An insgesamt 3 Schafen (n = 24 Proben) wurden bilateral jeweils im proximalen und distalen Humerus und Femur Bohrlochdefekte mit einer Tiefe von 13 mm und einem Durchmesser von 8 mm gesetzt. Die Füllung der Defekte mit jeweils einer der vier verschiedenen Scaffold-Gruppen wurde zufällig gewählt. Nach acht Wochen erfolgte die Schlachtung der Schafe und die gewonnenen Knochenproben wurden makroskopisch, radiologisch und histologisch untersucht. Besondere Beachtung galt den zellulären Reaktionen des Knochengewebes auf die unterschiedlichen Scaffold-Gruppen, indem nebst einer qualitativen Auswertung auch ein semi-quantitatives Score-System für die unterschiedlichen Zelltypen verwendet wurde. Eine statistische Auswertung erfolgte mittels einer faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA).

Alle vier Seiden-Scaffolds waren biokompatibel und zeigten eine vollständige Zellinfiltration innerhalb der 8 Wochen. Unterschiede bezüglich Zellinfiltration, Präsenz von Fremdkörperriesenzellen, oder Lymphozyten/Plasmazellen waren minimal ( $p < 0.05$ ). Knocheneinwachs- und neubildung waren nach diesem Zeitraum nur in geringem Maße vorhanden. Die Scaffolds wurden von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen abgebaut, dicht gefolgt von sich differenzierendem Knochengewebe und Vorläuferzellen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß die vier getesteten Seiden-Scaffolds biokompatibel sind, unabhängig von ihrem Herstellungsprozess bzw. der Herkunft der Seide. Sie können als Grundlage zur Dekoration mit biomimetischen Substanzen herangezogen werden.

## Summary

The aim of this study was to assess the biocompatibility of four different silk-scaffolds as a bone substitute, which differed both in the processing protocol and the source of the silk. The processing protocol differed mainly in the use of salt crystals or paraffin as porogens and the leaching process. On the basis of a previously developed drillhole-model, the suitability of the material was tested in 8 different locations in three sheep, where drill holes of 8 mm diameter and 13 mm in depth were placed bilaterally within the proximal and distal humerus and femur and scaffolds inserted at random distribution. After 8 weeks the sheep were sacrificed. The defects were examined macroscopically, radiologically and histologically through qualitative and semi-quantitative evaluation. Special focus was placed on cellular reactions of the bone tissue, such as cellular infiltration, presence of macrophages, foreign body giant cells and new bone formation. Statistical differences were calculated using factorial analysis of variance. Results demonstrated that no differences were found regarding cellular infiltration and bone formation dependent on processing or source of silk material and that all scaffolds proved suitable for use in bone. It was concluded that all types of scaffolds could be used for further studies as a basis for decoration with osteoinductive substances.

# 1 Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Ab der 2. Hälfte des 19. Jahrhunderts wurden Experimente durchgeführt, die sich mit der Suche nach geeigneten Knochenersatzmaterialien beschäftigten. Einer der ersten Forscher war Ollier (1859), der Tierstudien bezüglich Knochenersatz durchführte. Barth untersuchte bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts histologisch das Verhalten von Knochenimplantaten und brachte den Begriff „schleichender Ersatz“ hervor, d.h. Implantatumbau in empfängereigenen Knochen [1]. MacEwen führte 1880 die erste allogene Knochenimplantation durch. Die Verwendung von allogenem Spenderknochen birgt jedoch die Gefahr einer möglichen Übertragung infektiöser Erreger. Von Sykoff wurde 1900 das erste freie, autologe Knochenimplantat eingesetzt. Dieses entwickelte sich zum sogenannten „Goldstandard“ wegen seiner fehlenden Immunreaktion, osteogenetischen Potenz und ausreichender Stabilität [2] [3, 4]. Seine Verwendung ist allerdings mit vielerlei Nachteilen verbunden, wobei ein Zweiteingriff und die damit verbundenen Komplikationen oder auch die Tatsache, daß dieses Material nur eingeschränkt verfügbar ist, die wichtigsten sind. Unter anderem warf dieses Faktum die Nachfrage nach Ersatzmaterialien für Knochengewebe auf, nicht nur zur Defektauffüllung sondern auch für Fusionen im Bereich der Wirbelsäule, Arthrodesen und Frakturpräventionen bei Osteoporotikern. Bei derartig entwickelten Materialien handelt es sich um sogenannte Biomaterialien. Diese werden definiert als „nicht körpereigene Substanzen, die nach der Implantation in den menschlichen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und deren (Teil-) Funktionen ersetzen“ [5]. Die Ziele sind nicht nur auf den bloßen Ersatz beschränkt, sondern die Knochenheilung soll ebenfalls positiv beeinflusst werden. So soll beispielsweise die Menge und Qualität neugebildeten Knochens verbessert, die Zeiteinheit, in der Knochenneubildung und –heilung stattfindet, beschleunigt und ein mechanisch besser belastbares Implantat als beispielsweise das knöcherne autogene, entwickelt werden.

Die Materialien unterscheiden sich durch ihre Grundkomponenten, Materialzusammensetzung und ihre Porosität [6]. Neben Biokompatibilität und Resorbierbarkeit sollte das Ersatzmaterial die Knochenzellproliferation fördern und das Einsprossen von Blutgefäßen zulassen [7]. Die oben bereits angesprochenen Nachteile allogener Transplantate, wie z.B. die Gefahr einer Fremdkörperreaktion und das Infektionsrisiko, haben zur Entwicklung alloplastischer Ersatzmaterialien beigetragen. Sie entstammen natürlichem Gewebe oder werden aus organischen oder anorganischen Substanzen hergestellt und sind durch biotechnische Verfahren modifiziert [8] [9]. Im Gegensatz zum autologen Knochen sind diese Materialien nahezu in unbegrenzter Menge verfügbar. Es handelt sich dabei um nicht resorbierbare und resorbierbare Substanzen. Zu den langsam resorbierbaren Materialien wird u.a. auch Seide gezählt, welche bereits eine lange medizinische Geschichte besitzt [10, 11]. Aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften (vor allem Reißfestigkeit) bietet sie gegenüber anderen Biomaterialien bestimmte Vorteile und ihre Anwendungsmöglichkeiten werden in diversen Bereichen geprüft. Die in dieser Studie zu beurteilenden Seiden-Scaffolds waren bereits Gegenstand anderer Labor- und tierexperimenteller Untersuchungen [12, 13]. So sollte z.B. in einer noch nicht veröffentlichten Studie der Universität Zürich am Schaf deren Anwendbarkeit als Knochenersatz, vergleichend mit autologem Knochentransplantat und Hydroxyapatit-Granula, im subchondralen Knochen direkt 4 mm unterhalb des darüber liegenden, hyalinen Knorpels getestet werden. Dabei zeigte sich, daß die mechanischen Eigenschaften der Seide günstiger als die der Hydroxyapatit-Granula und ähnlich dem autologen Spongiosatransplantaten waren. Jedoch traten hierbei nicht erwartete Fremdkörperreaktionen auf, durch Infiltration von Fremdkörperriesenzellen, Lymphozyten und Plasmazellen, sowie Abschottung des Implantates durch eine Bindegewebskapsel vom benachbarten Knochen, welche die Notwendigkeit unterstrich, die Ursache dieser Reaktionen zu ermitteln. Dies sollte mit der vorliegenden Studie geklärt werden.



## **1.2 Zielsetzung der Arbeit**

Bei der nachfolgend beschriebenen Studie sollte die Biokompatibilität von Seiden-Scaffolds unter Berücksichtigung der Seidenherkunft und des Herstellungsprozesses gezeigt werden.

Die erlangten Erkenntnisse sollen als Hinweis auf die klinische Anwendbarkeit dieses Materials in der Therapie von Knochenverlusten dienen.

## **1.3 Versuchsanordnung**

Eine Gruppe von drei Schafen wurde operiert. Je Schaf wurden acht Löcher in Form eines Bohrloch-Defekts gebohrt und diese mit jeweils einem der vier verschiedenen Seiden-Scaffolds gefüllt. Nach zwei Monaten erfolgte die Schlachtung der Tiere. Die gewonnenen Proben wurden makroskopisch beurteilt, aufbereitet und histologisch untersucht.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Schaf als Versuchstier**

Zur Erforschung von Krankheiten und deren Behandlungsmöglichkeiten sind im Allgemeinen nach wie vor Tiermodelle nötig. *In vivo* - Studien können im Modell unter genau kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden, die in klinischen Studien nicht erreicht werden können. Davidson et al. (1987) erörterte einige Anforderungen diesbezüglich, wie beispielsweise die Eignung als Analog, Kosten und Verfügbarkeit, sowie ethische Aspekte [14]. Für die *in vivo* - Prüfung neuer Knochenersatzmaterialien wurden zahlreiche Modelle mit unterschiedlichen Tierarten wie Ratte [15-17], Kaninchen [18], Hund [19, 20] und unterschiedlichen Implantationsweisen wie subcutan [21] oder intraossär [22-24] entwickelt. Die Verwendung des Versuchstieres Schaf nimmt jedoch in der orthopädischen Forschung immer mehr zu. Dessen Ähnlichkeit zum Menschen bezüglich Gewicht, Knochenaufbau und Knochenregeneration kann als Grund hierfür genannt werden [25, 26]. Hinzu kommt, daß diese Tiere unter artspezifischen Bedingungen kostengünstig gehalten werden können und diesbezüglich ethische Bedenken wie beispielsweise bei Hunden oder Primaten weniger stark ausgeprägt sind.

### **2.2 Bohrlochmodell**

Anhand dieser Methode konnte ein Fortschritt in der Standardisierung von Biokompatibilitätstests neuer Materialien erzielt werden [27-29]. Pro Tier können bis zu 8 verschiedene Materialien getestet werden, was eine Reduzierung der Versuchstierzahl ermöglicht. Die Bohrung der Defekte (Tiefe 13 mm, Durchmesser 8 mm) erfolgt in der proximalen und distalen Epiphyse und Metaphyse von Humerus und Femur [27] (*Abb. 1*).

## 2.3 Knochenersatzmaterialien bzw. Biomaterialien

Viele pathologische Ereignisse gehen mit dem Verlust von Knochensubstanz einher. Weltweit besteht in der Frakturirurgie, der posttraumatischen Wiederherstellungschirurgie, der Tumorchirurgie u.a. ein großer Bedarf an Knochenersatz. Allein in Deutschland werden beispielsweise pro Jahr mehr als 100.000 Operationen am Knie und Hüftgelenk durchgeführt [30]. Ziele bei der Therapie von Knochendefekten jeglicher Art, ist die Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes – die „restitutio ad integrum“.

Hierfür kommen (a) Knochentransplantate oder (b) Knochenersatzstoffe in Frage:

(a) Autologe, allogene und xenogene Transplantate werden nach wie vor erfolgreich als Knochenersatz eingesetzt. Als sogenannter Goldstandard galt hierbei, wie bereits angesprochen, die Therapie mit autologem Knochentransplantat aufgrund seiner hohen biologischen Wertigkeit (osteogenetisch, - induktiv und – konduktiv) [1, 5, 31]. Osteogenetische Eigenschaften besitzen Gewebe mit lebenden Zellen, welche sich zu knochenbildenden Zellen differenzieren können.

Als Osteokonduktivität wird die Fähigkeit eines Stoffes, als Leitschiene für einwachsende Gefäße und neu gebildete Knochenstrukturen zu fungieren, bezeichnet. Dies ist der Unterschied zur Osteoinduktion, die durch einen biologischen Stimulus (z.B. Wachstumsfaktoren, wie bone morphogenetic protein = BMP) impliziert, aus benachbartem Muskel und Bindegewebe stammende Mesenchymalzellen zu Knochenzellen differenzieren läßt.

Bei autologen Transplantaten wird Knochenmaterial aus einem Individuum gewonnen und an einem anderen Ort desselben eingesetzt. Je nach Zusammensetzung des gewonnenen Materials spricht man von aspiriertem Knochenmark, kortikalen- oder spongiösen Transplantaten [8, 32, 33].

Dieses Verfahren bringt allerdings auch viele Nachteile mit sich, wie beispielsweise die Notwendigkeit eines Zweiteingriffs und mögliche Komplikationen hierbei, sowie eine limitierte Verfügbarkeit [34-36]. Unter anderem aus diesen Gründen und auch wegen des bei allogenen Transplantaten (d.h. Übertragung von einem Individuum auf ein anderes der gleichen Spezies) und xenogenen Transplantaten

(Knochengewebe wird von einer Spezies auf eine andere übertragen) immer wieder beobachteten infektiösen Potentials [29, 37], wurde in den letzten Jahren nach Alternativen gesucht. In der Folge kam es zur Entwicklung sowohl natürlicher als auch synthetischer Knochenersatzmaterialien.

(b) Die Biomaterialforschung befasst sich mit unterschiedlichen Substanzen, welche menschliches Gewebe ersetzen oder stützen sollen. Ein Vorteil bioresorbierbarer Materialien ist, daß sie einen zweiten operativen Eingriff vermeiden und somit auch weniger stationäre Behandlungskosten nach sich ziehen.

Diese Substanzen werden in folgenden medizinischen Einsatzgebieten angewendet oder befinden sich noch in der Entwicklung: als chirurgisches Nahtmaterial, Osteosynthesematerial und als Träger für „tissue engineering“-Materialien, Wachstumsfaktoren oder Medikamente.

Zur Vollständigkeit soll hier ein kurzer Überblick über die Klassifizierung und Eigenschaften von Biomaterialien gegeben werden [5].

#### Klassifizierung von Biomaterialien:

- I. Biologische, organische Substanzen (z.B. mineralisierte und demineralisierte Knochenmatrices, extrahierte Knochenwachstumsfaktoren, BMP-2, chemotaktische oder induktive Faktoren, wie z.B. Transforming Growth Factor, Interleukine)
- II. Synthetische, anorganische (monophasische synthetische Verbindungen, Hydroxyapatit-Keramikanaloga aus Korallen bzw. Algen oder bovinen Knochen, Biogläser, mehrphasische Glaskeramiken und calciumphosphathaltige Knochenzemente)
- III. Synthetische, organische Verbindungen (z.B. Polyester, Polyamino-säuren)
- IV. Komposite (unterschiedliche Kombinationen aus I-III)

#### Eigenschaften:

a) Osteokonduktion:

Das Material bildet ein Gerüst, welches das Einwachsen von neu gebildetem Knochen ermöglicht -> Leitschieneneneffekt (z.B. Hydroxyapatit-Keramik)

b) Osteoinduktion:

Knochenneubildung durch Implantation einer acellulären Substanz (z.B. BMP) an einen Ort außerhalb des bestehenden Knochengewebes

c) Osteostimulation:

Förderung der Knochenheilung über das individuell-physiologische Maß hinaus (z.B. Implantation von Prä- o. Osteoblasten)

Neben den Eigenschaften des Biomaterials zum Einwachsen und zur Differenzierung der Zellen, zählen auch diejenigen des Abbaus (Biodegradierbarkeit) des Materials im Gewebe selbst.

Dabei wird auch zwischen mehreren Möglichkeiten unterschieden:

Biodegradierbar/resorbierbar sind:

Polylactic Acid (PLA) / Polyglycolic Acid (PGA) / Tricalciumphosphat (TCP)

In Knochen umbaubar sind:

Calciumphosphathaltige Knochenzemente

Applikationsmöglichkeiten:

III. Klasse in jeder beliebigen Form herstellbar,

II. Klasse als Granulate, Blöcke, injizierbar und *in situ* als aushärtende Pasten; Wachstumsfaktoren mit anderen Biomaterialien als Trägersubstanz kombiniert; Keramiken: Kristallgröße, Mikro-/Makroporosität und Interkonnektion wichtig (Porosität entscheidend für Neovascularisation bei Hydroxyapatit-Keramik).

Eine große Bedeutung bezüglich ihrer Anwendbarkeit hat zudem noch sowohl die biomechanische Belastbarkeit der Materialien als auch das Sterilitätsverfahren, da dieses wiederum Einfluß haben kann auf die bereits genannten Eigenschaften [31].

Neben vielen Materialien, von denen die oben genannten nur kurz angesprochen werden sollten, wurde dem Einsatz von Seide als Knochenersatzmaterial ein wachsendes Interesse zuteil.

## **2.4 Seide als Knochenersatzmaterial**

Die Seidenfaser besteht vor allem aus zwei Arten Protein: aus Fibroin (ca. 70-80%) und aus Sericin (ca. 20-30%), welches das Fibroin umhüllt. Die Unterschiede bezüglich Aufbau, Struktur und Eigenschaften sind abhängig von der jeweiligen Quelle (Seidenraupe, Spinne, etc.) [38].

In den letzten Jahren wurde die Verwendung von Seidenfibroin in vielerlei Hinsicht getestet, um ein geeignetes Implantat- und Matrixmaterial zu entwickeln, welches die Regeneration des Gewebes begünstigt [38, 39], da Seidenfibroin gegenüber anderen Biomaterialien einige Vorteile bietet.

Zwar werden viele synthetische degradierbare und nicht-degradierbare Polymere erfolgreich als Biomaterialien angewendet, aber diesen sind Grenzen gesetzt, beispielsweise in der Vielfältigkeit der chemischen Zusammensetzung oder es treten Probleme im Zusammenhang mit Hydrolyseprodukten auf.

Auch Alginat und Collagene als Biopolymere wurden eingehend getestet, besonders in ihrer Anwendbarkeit als Scaffolds in der Geweberegeneration.

Als Vorteile dieser Polymere sind Degradierbarkeit und Biokompatibilität hervorzuheben.

Trotzdem besteht ein weiterer Bedarf an Stoffen, bei welchen man zudem bei der Herstellung die Zusammensetzung, Struktur, Architektur, Funktion und mechanischen Eigenschaften genau im Voraus kontrollieren kann [40].

Seide stellt hierbei eine einzigartige Gruppe von Proteinen dar, mit einer sehr hohen Beanspruchbarkeit, die einem mechanisch robusten Biomaterial entsprechend würde.

Wegen ihrer außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaft und der Möglichkeit, ihre Struktur und somit auch Funktion genetisch zu beeinflussen, wird der Gebrauch von Seide als Scaffold untersucht [40].

Die in der Vergangenheit immer wieder berichteten Biokompatibilitätsprobleme, meist im Zusammenhang mit Sericin [41, 42], wurden in jüngerer Zeit eingehend erforscht und konnten weitgehend gelöst werden.

Damit war die Basis für die Anwendung von Seiden-Scaffolds geschaffen. Santin et al. zeigte, daß durch die Entfernung von Sericin die Entzündungsreaktionen des Gewebes auf Seidenfibroin beseitigt werden konnten [43]. Panilaitis et al. verglich das Entzündungspotential von Seide in verschiedenen Kompositionen (u.a. unbearbeitete native Fasern, extrahiertes Fibroin ohne Sericin etc.) [44]. Meinel et al. zeigte gleichartige Entzündungsreaktionen *in vitro* von aus Knochenmark stammenden mesenchymalen Stammzellen auf, die auf Seiden-, Seiden-RGD- und auf Kollagen-Scaffolds sowie auf Seiden-Folien (bzw. Film) gezüchtet und gewachsen waren [45]. Viele Möglichkeiten bestehen, Seide zu modifizieren bzw. anzuwenden, was u.a. mit der Tatsache zusammenhängt, daß sie bei physiologischen Temperaturen stabil ist und unlöslich in wässrigen und organischen Lösungen [46].

Fini et al. prüfte beispielsweise deren Verwendung als Hydrogel und kam zu einem positiven Ergebnis [47]. Altman et al. zeigte zusammenfassend sowohl die Vorzüge, wie langsame Degradierung *in vitro* und *in vivo* (da es sich um ein Protein handelt, entspricht die Degradierung einem proteolytischen Abbau), die lange Geschichte in der medizinischen Anwendung als Nahtmaterial etc., als auch die Bedenken (ausreichende Entfernung des Sericins etc.) bezüglich der Verwendung von Seide. Außerdem wies er auf die Möglichkeiten der Verarbeitung von Seidenfibroin zu Schaum, Folien, Fäden und Netzen hin [38]. Den Einsatz von mit Seidenfibroin beschichteten Liposomen in der gezielten Pharmakotherapie untersuchte Gobin et al. [48]. Dabei konnte er zeigen, daß Seidenfibroin für jegliche Art von „drug coating“ verwendet werden kann.

## **2.5 Biokompatibilität**

Die Verträglichkeit zwischen künstlichem Material und biologischem System wird durch den Begriff Biokompatibilität beschrieben. Nach der Definition von Williams

versteht man darunter „die Fähigkeit eines Materials, eine für eine bestimmte Anwendung angemessene Gewebereaktion hervorzurufen“ [49]. Zwar wird Biokompatibilität kontrovers diskutiert [50-52], aber man ist sich einig darüber, daß die Biofunktionalität Ausdruck des Ausmaßes und der Intensität der Gewebereaktion ist. Fremdkörperreaktion sowie Biokompatibilität sind von diversen Parametern abhängig, wie beispielsweise chemischer Zusammensetzung, Oberflächenbeschaffenheit, Morphologie, Lokalisation des Implantates und chirurgischem Verfahren.

Vor allem bei degradierbaren Materialien muss die Biokompatibilität sorgfältig untersucht werden, weil die Degradationsprodukte den pH-Wert ihrer Umgebung ändern, das Gewebe durch ihre Akkumulation schädigen oder selbst toxische Effekte haben können [53].

## **2.6 Wundheilung und Fremdkörperreaktion**

Ein chirurgisches Implantat stellt einen Fremdkörper dar und verursacht somit eine Abwehrreaktion des Organismus. Die biologische Reaktion des Empfängers auf implantiertes Material umfasst systemische und lokale Wirkungen. Zu den lokalen Gewebereaktionen gehören Entzündungen, Neubildungen und Nekrosen. Beispiele für systemische Wirkungen sind Endorganzerstörung, Karzinogenität und immunologische sowie allergische Reaktionen [54].

Die biologische Antwort wird vom chemischen Verhalten, den mechanischen und elektrischen Eigenschaften sowie dem Widerstand gegen Degradation und Korrosion der Materialien beeinflusst.

Die Implantation von Materialien hat eine Reihe von biologischen und zellulären Abläufen zur Folge, die eine sekundäre Wundheilung bedingen. Deren erster Schritt ist die Entzündung. Sie dient der Zerstörung, der Verminderung oder Einkapselung des Implantates. Eine instabile Implantatpositionierung kann die Entzündungsreaktionen verstärken, da Mikrobewegungen zugelassen werden.

Die akute Phase der Entzündung ist gekennzeichnet durch Exsudation von Flüssigkeit und Plasmaproteinen und den Austritt von neutrophilen Leukozyten.



Die chronische Phase kann histologisch durch die Anwesenheit von Makrophagen, Lymphozyten sowie Proliferation von Fibroblasten und kleinen Blutgefäßen nachgewiesen werden.

Man geht davon aus, daß u.a. Implantationsort, Größe, Geometrie und Oberflächenbeschaffenheit das Ausmaß der Fremdkörperreaktion beeinflussen können [55].

## **2.7 Zellen**

Die Reaktion des Organismus auf Implantate kann man als natürliche Reaktion auf einen unnatürlichen Reiz bezeichnen [56]. Daran sind diverse Zellen beteiligt, wie Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten/Plasmazellen, Fibroblasten etc.

Im Folgenden wird kurz auf diejenigen Zellen eingegangen, die zu den sogenannten Abwehrzellen zählen. Antikörperproduzierende Lymphozyten bzw. Plasmazellen werden in größerem Ausmaß besonders bei chronischen Entzündungen angetroffen [51, 55, 57]. Neutrophile Granulozyten eher in einem frühen Stadium der Wundheilung bzw. direkt postoperativ [58].

Makrophagen entstammen den Stammzellen des Knochenmarks und phagozytieren untergegangene Zellen, nekrotisches Gewebe und körperfremdes Material mithilfe hydrolytischer Enzyme in ihren Lysosomen. Einige Autoren sehen das Auftreten von Makrophagen als Teil einer chronischen Entzündung, andere eher als Teil des normalen Degradationsprozesses [29, 59, 60].

Besonderes Interesse gilt den multinukleären Riesenzellen, welche von fusionierten Makrophagen stammen [61]. Was genau die Fusion beeinflusst, ist bis dato noch nicht ausreichend geklärt. Ihre Rolle wird immer wieder diskutiert, wobei die zentrale Frage ist: kann man sie als Zeichen unzureichender Biokompatibilität oder normaler Degradierung bewerten? Die Argumente, Fremdkörperriesenzellen als positiv anzusehen, sind folgende: a) diese Zellen sind Bestandteil der normalen Wundheilung auf inerte oder degradierbare Biomaterialien [57, 62], b) ihre Anwesenheit beeinflusst nicht weiter die Knochenbildung [63], c) sie sind ein Indiz für geringe Degradierbarkeit [64, 65], d) Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen

vermitteln Resorption und Fragmentierung von biodegradierbaren Implantaten [64, 66, 67].

Folgende Fakten verleihen Fremdkörperriesenzellen ein negatives Image: a) ihre Fusion wird von schlecht tolerierten Fremdkörpern induziert [68-70], b) indem man die Anlagerung von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen-Formation verhindert hat, konnte die entzündliche Degradierung auf ein Minimum reduziert werden [71], c) ihre Anwesenheit wird assoziiert mit Struktur- und Funktionsverlust des Implantates [72].

Folgender Faktor sollte nicht außer Acht gelassen werden: Für degradierbare Materialien wie die Seiden-Scaffolds sind Makrophagen bzw. Fremdkörperriesenzellen sogar nötig, da sich ohne sie eine dicke fibröse Kapsel um das Implantat bilden würde, denn wenn der Körper nicht in der Lage ist, das implantierte Material abzubauen, versucht er es als nächsten Schritt zu isolieren. Diese mehr oder weniger gefäßarme Kapsel limitiert weitere Interaktionen.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Aufbau der Studie**

Die Anzahl der Versuchstiere konnte aufgrund des bereits beschriebenen Tiermodells auf 3 Schafe beschränkt werden [27]. Der zeitliche Abstand zwischen Operation und Schlachtung betrug zwei Monate.

Die Aufteilung der verschiedenen Seiden-Scaffolds auf die jeweiligen Tiere erfolgte anhand einer Zufallsverteilung per Computer.

### **3.2 Tiermodell**

Das Tierexperiment wurde von der Kantonalen Tierversuchskommission des Bundesamtes für Veterinärwesen, Veterinäramt Zürich genehmigt und entsprechend der Gesetzgebung der Schweiz für den Tierschutz (Bewilligungsnummer: 188/2004) durchgeführt.

### **3.3 Eingesetzte Materialien**

Die vier Arten von Seiden-Scaffolds unterschieden sich sowohl bezüglich ihres Herstellungsprozesses, wobei als Porogen entweder Salzkristalle (anschließende Extraktion mit Ultra Pure Water „UPW“ / Herstellungsprotokoll ETH Zürich) oder Paraffin (anschließende Extraktion mit Hexan „HFIP“ / Herstellungsprotokoll Tufts Universität) verwendet wurde, als auch in der Herkunft der Seide. Die von der Tufts Universität (Medford, MA, USA) verwendete Seide stammt von Kokons der

Seidenraupe *Bombyx mori*, bezogen von M. Tsukada (Institute of Sericulture, Tsukuba, Japan) und Marion Goldsmith (University of Rhode Island, Cranston, RI). Von Trudel Inc. (Zürich, Schweiz) erhielt die ETH Zürich Seidenraupenkokons aus China.

Im nachfolgenden wird nur noch die Kurzform (z.B. „HFIP Tufts“) verwendet, was bedeutet: Fabrikationsprozess erfolgte mit HFIP, Seidenquelle der Tufts Universität (Tab. 1). Die *Bombyx mori*-Kokons wurden nach einem bestimmten Verfahren zu gereinigten Seidenfasern aufbereitet [13]. Diese stellten die Ausgangsbasis für die Herstellung der Seiden-Scaffolds dar (Abb. 2).

### 3.4 Vorbereitung der Tiere

Die für den Versuch verwendeten Tiere waren jeweils zweijährig, adult und männlich/kastriert. Alle Schafe entstammten aus demselben, eigenen Zuchtbetrieb. Das Körpergewicht lag bei 53 kg, 66 kg und 70 kg (Durchschnitt: 63 kg). Die Tiere wurden einer Ankaufsuntersuchung, sowie einer antiparasitären Behandlung mit Ivermectinum s.c. (0,5 ml pro 25 kg; Ivomec®; Merial, Vertrieb Biokema) unterzogen. Beim Ankauf wurde den Tieren auch Blut mithilfe eines Vacutainersystems (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) entnommen, welches serologisch auf Maedi/Visna-Antikörper am Virologischen Institut der Universität Bern untersucht wurde. Es wurden nur negativ getestete Tiere in der Studie verwendet.

Nach der Ankaufsuntersuchung erfolgte eine Schur, Klauenpflege und die Kennzeichnung mit bestandseigenen Ohrmarken. Die Tiere verblieben bis kurz vor der geplanten Operation zusammen mit dem Rest der Herde in einem großen Stall mit Weideauslauf. Sie wurden dort mit alternierenden Antiparasitika behandelt und mit Pulpyvax®T s.c. (Essex Tierarznei, Vertrieb Veterinaria AG, Bern, Schweiz) gegen Breinierenkrankheit und Tetanus geimpft.

Eine Woche vor der Operation wurden die Tiere in die Stallungen des Tierspitals Zürich verbracht.

Es folgte eine erneute Blutentnahme mithilfe des Vacutainersystems. Um eventuelle Operationsrisiken auszuschließen, wurde das Blut hämatologisch und blutchemisch

untersucht. Zwei Tage vor dem Operationstag wurden die Schafe gewogen und im Bereich Karpalgelenk bis Schulterblatt, Hals, sowie Tarsal- bis Hüftgelenk erneut geschoren. Anschließend erfolgte die Umstellung in eine mit Sägespan eingestreute Box. 24 Stunden vor der Operation erfolgte Futterentzug.

### **3.5 Operation**

Am Tag der Operation wurden die Schafe klinisch untersucht. Die analgetische und sedative Prämedikation erfolgte mit Xylazin und Burprenorphin i.m. (0,01 mg/kg; Temgesic®; Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz). 30 Minuten danach wurden die Schafe in den Operationsraum geführt. Hier erfolgte zunächst die Reinigung des freigeschorenen Halsbereiches mit Seife, sowie die anschließende Desinfektion mit Chlorhexidin und Alkohol (Hibitane® Tinktur; SSL Healthcare Schweiz AG; Reinach, Schweiz). Ein Venenverweilkatheder (Vygonüle S G14; Vygon GmbH; Aachen, Deutschland) wurde danach in die Vena jugularis gelegt, in Kombination mit einem IN-Stopper (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) als Verschlussvorrichtung.

Anschließend bekamen die Schafe eine Infektionsprophylaxe bestehend aus Gentamycin i.v. (6 mg/kg; G. Streuli AG; Uznach, Schweiz) und Benzylpenicillin i.v. (30000 I.U./kg; Penicillin „Grünenthal 10 Mega“; Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland). Zudem wurde als nicht steroidales Antiphlogistikum Carprofen i.v. (4 mg/kg; Rimadyl®; Pfizer, Vertrieb Dr. Gräub AG, Bern, Schweiz) appliziert und zur Tetanusprophylaxe 1000 I.U. equines Tetanustoxin (Tetanusserum Intervet; Vertrieb Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) s.c. verabreicht.

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Ketamin i.v. (2 mg/kg; Narketan 10®; Chassot GmbH, Deutschland) und Diazepam i.v. (0,1 mg/kg; Valium®; Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz).

Zur Intubation wurde bei Bedarf noch zusätzlich 2-4 mg/kg Propofol gegeben. Nach lokaler Betäubung des Kehlkopfes mit einem Sprühstoß Lidocain (entsprechend 10 mg; Xylocain® Spray, Astra Pharmaceutica AG, Dietikon; Schweiz) wurden die Tiere mit Endotrachealtuben der Größen 10-14 intubiert. Die Anästhesie wurde mit 1-1,5%

Isofluran (Forene®: Abbott AG, Baar, Schweiz) in O<sub>2</sub> als Inhalationsnarkose und einer Dauertropfinfusion Ringerlösung mit 60 mg Ketamin pro Liter Lösung in einer Dosierung von 10 ml/kg KM/h fortgeführt. Ein arterieller Ohrkatheter wurde zur intraoperativen Blutdruckmessung gelegt.

Für die Operation wurden nebst einem Standard-Operationsbesteck auch noch folgende Instrumente benötigt: Weitlaner und Gelpi Wundspreizer, Rasparatorium, Druckluft-Bohrmaschine (Synthes, Waldenburg, Schweiz), 8mm Spezialbohrer mit Tiefstellring (KaVo INTrASurg 500®, KaVo Dental AG Biberach, Deutschland) und entsprechender Bohrerschutzhülse [27] (*Abb. 3*).

Die Positionierung der Schafe auf dem Operationstisch erfolgte in Seitenlage. Mittels Polsterung wurde sowohl eine waagrechte Lagerung der Gliedmaßen erzielt, als auch eine Stütze, damit die Gliedmaße beim Bohrvorgang nicht nach unten verschoben werden konnte. Der Zugang erfolgte jeweils von der lateralen Seite. Die Cornea wurde mit einer epithelschützenden Augensalbe (Vitamin A Dispersa®; Novartis AG, Bale, Schweiz) vor Austrocknung bewahrt. Der Bereich der Hautschnitte wurde standardmäßig aseptisch vorbereitet mit Hibiscrub®-Seife, Alkohol (70%) und Hibitane®-Tinktur.

Bei der Lagerung der Vordergliedmaße war zu beachten, daß sie bei leichter Beugung so positioniert sein sollte, daß der laterale Epicondylus des Condylus Humeri leicht subcutan palpiert werden konnte. Die Hintergliedmaße sollte ebenfalls leicht gebeugt werden, sodaß das laterale Kollateralband im Kniegelenk durch die Haut ertastet werden konnte.

Dabei wurde versucht, die Hautschnitte und Freipräparation des Knochens so gering-invasiv wie möglich zu halten. Zur Erleichterung des Zuganges zum Knochen, wurden die Wunden nach dem Hautschnitt mit dem Weitlaner Wundspreizer oder in Kombination mit diesem und dem Gelpi-Spreizer gespreizt.

Das Rasparatorium wurde zum Abschaben von Weichteilgewebe am Knochen verwendet, damit die Bohrschutzhülse problemlos ohne Abgleiten auf den Knochen positioniert werden konnte.

Die genauen Zugänge erfolgten folgendermaßen [27]:

### **3.5.1 Proximaler Humerus**

Lateral vom Akromion leicht bogenförmig über das Buggelenk bis zum mittleren Drittel des Humerus wurde der Hautschnitt auf einer Länge von ca. 8 cm gesetzt. Zwischen dem M. trapezius und dem M. omotransversarius war der darunterliegende M. deltoideus pars acromialis, zu erkennen. Dieser wurde Richtung caudal verlagert, wodurch die untergelagerte Endsehne des M. infraspinatus in Erscheinung trat. Caudal der Sehne erfolgte die Bohrung in medialer Richtung.

### **3.5.2 Distaler Humerus**

Ebenfalls lateral, über dem Epicondylus humeri, erfolgte ein leicht bogenförmiger Hautschnitt. Nach Eröffnung der subcutanen und tiefen Faszie konnte der laterale Bandhöcker getastet werden. Distal davon ist das Ligamentum collaterale laterale gespannt. Dieses wurde im Faserverlauf gespalten. Die Bohrschutzhülse konnte dann nach Spreizen der Sehnenschenkel in die darunter liegende Bandgrube gesetzt werden.

### **3.5.3 Proximaler Femur**

Nach subcutaner Palpation des Trochanter major wurde direkt über diesen der Hautschnitt gesetzt. Die Fascia subcutanea wurde durchtrennt und somit der M. gluteus medius sichtbar. Durch diesen wurde stumpf durchpräpariert, anschließend die darunter befindliche Fascia lata eröffnet. Den Zugang zum Knochen erreichte man durch den M. vastus lateralis des M. quadrizeps hindurch, direkt unterhalb des Trochanter major.

### 3.5.4 Distaler Femur

Zunächst wurden folgende Knochenstrukturen palpiert: die Patella, die Tuberositas tibiae sowie das Tibiaplateau. Dann erfolgte der Hautschnitt zwischen der Patella und dem Condylus lateralis tibiae. Mit der Durchtrennung der subcutanen Faszie konnte die Endaponeurose des M. biceps femoris dargestellt werden. Die Muskelfaszie wurde mit einem kleinen Einschnitt von ca. 2 cm Länge eröffnet, danach der Muskel stumpf bis zum lateralen Condylus femoralis präpariert. Proximal des Ursprungs des Ligamentum collaterale laterale wurde gebohrt.

Die Bohrlöcher hatten jeweils einen Durchmesser von 8 mm und eine Tiefe von 13 mm. Wie bereits beschrieben, ergab sich pro Schaf eine Anzahl von 8 Bohrlöchern. Ungefähr 10 Minuten vor der Implantation wurden die einzusetzenden Scaffolds bei Raumtemperatur in eine 20 ml Spritze gefüllt und diese zuerst mit NaCl vollgesogen, um die Scaffolds gut zu durchtränken (*Abb. 4*).

Kurz vor dem Einsatz in die Bohrlöcher wurde die Luft aus den Scaffolds entfernt, indem man in der Spritze ein Vakuum schaffte. Danach wurden sie noch kurz in Blut getränkt.

Nach Füllung der Bohrlöcher mit dem entsprechenden Seiden-Scaffold (*Abb. 5*), erfolgte der dreischichtige Wundverschluss mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 2/0, Johnson & Johnson Intl., Brüssel, Belgien) in einfach fortlaufender Adaption. Darauf folgte eine einfach fortlaufende Subkutannaht, ebenfalls mit Vicryl® 2/0. Die Haut wurde mit metallenen Staples geklammert (Davis + Geck Appose ULC®; Vertrieb B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) und anschließend ein Deckverband aus Gazetupfern mit einigen Staples angebracht.

Zum Schluß wurde eine neue, projektbezogene Ohrmarke eingezogen.

Nach Erwachen aus der Narkose und Extubation wurden die Tiere für 14 Tage in einer kleinen Box untergebracht, die mit Stroh eingestreut war. Sie erhielten dort Futter und Wasser ad libitum. Während dieser Zeit wurden die Schafe täglich einer klinischen Untersuchung unterzogen.

Außerdem wurde die präoperativ eingeleitete Antibiose mit Benzylpenicillin (30000 I.U./kg) und Gentamycin (6 mg/kg) jeweils zweimal am Tag i.v., vier Tage lang



fortgesetzt. Zur Schmerztherapie wurde Burprenorphin (0,01 mg/kg) postoperativ 24h lang in Intervallen von 6 Stunden i.m. appliziert.

Vier Tage nach der Operation wurde der Gazeverband entfernt und der Katheder gezogen. Die Entfernung der Staples aus der Hautnaht erfolgte 10 Tage nach der Operation. Anschließend wurden die Schafe bis zum Schlachttermin in eine große Box mit Auslauf verbracht.

## **3.6 Probenaufbereitung und –auswertung**

### **3.6.1 Gewinnung und Aufbereitung der Proben**

Nach acht Wochen wurden die Schafe geschlachtet. Vor der Entblutung erfolgte die Betäubung mit einem Bolzenschußapparat. Der anschließende Schnitt in die Halsgefäße führte zum Tod durch Entbluten. Unmittelbar nach der Schlachtung wurde das über den Operationsstellen liegende Gewebe mit Skalpell, Schere und Pinzette entfernt.

Dann wurde die Implantationsstelle adspektorisch und palpatorisch untersucht und mit einer Digitalkamera (Ixxus 40, Canon) photographiert. Mittels einer Bandsäge (Kolbe Maschinenteknik GmbH, Elchingen, Deutschland) wurden aus den Knochen kleine Blöcke geschnitten, in deren Mitte sich das Implantat befand.

Von den herausgesägten Stücken wurde eine Mikroradiographie (50 kV, 1 sec, 3 mA; Faxitron X-Ray Systems; Hewlett Packard, Mc Minnville Division, Oregon, USA) in dorsoventralem Strahlengang angefertigt. Danach wurden die Blöcke in Falcon-Tubes gelegt und mit 4% Formalin im Verhältnis 1:10 (Probenvolumen : Formalin) übergossen und bei 4°C aufbewahrt.

Anschließend wurden die Proben 4 x 20 min. gewässert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50% =3x30 min.; 70%=2x12 h; 80%=2x12 h; 90%=1x12 h; 96%=1x12 h; 100%=4x12 h) entwässert. Daraufhin wurden die Blöcke 4 Tage lang in Xylol unter Vakuum bei Raumtemperatur entfettet und das Xylol nach einem Tag gewechselt.

Das Xylol wurde abgegossen und die Proben während einer Woche mit Methylmetacrylat bei 4°C unter Vakuum infiltriert.

Die Herstellung des Methylmetacrylates erfolgte nach folgendem Schema:

Methacrylsäure-methylester (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphthalat (Merck-Schuchardt, Hohenbunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) wurden im Verhältnis 89,5 : 10 : 0,5 gemischt und 10 min. mit dem Magnetrührer gerührt.

Anschließend wurden die Proben in luftdichte Teflonformen gelegt, mit Methylmetacrylat übergossen und bei 32°C im Wasserbad bis zur vollständigen Polymerisation belassen.

Mit Leica Historesin Mounting Medium® wurden Plastikrahmen auf die ausgehärteten Proben geklebt und als Blöcke aus den Formen gehoben. Diese waren nach Beschriftung schnittbereit.

Mit einer Präzisionsinnenlochsäge (Leica® SP1600, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden Dickschnitte von 300 µm gesägt. Pro Block wurden ein Dickschnitt und 4 Dünnschnitte von je 5 µm (Mikrotom, Leica® RM2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) hergestellt. Die Schnittebene wurde parallel zur Knochenoberfläche, ca. auf Höhe der Mitte des Scaffolds geführt.

Die Dickschnitte wurden mit entionisiertem Wasser gereinigt, mit Alkohol entfettet und auf mit Alkoholspülung vorbereitete Acrylglasplatten (Perspex GS 3 mm; Wachendorf AG Technische Industrieprodukte, Basel, Schweiz) aufgeklebt (Klebstoff: Cementit® CA12; Merz+Benteli AG, Niederwangen, Schweiz). Anschließend wurden diese Schnitte mit einer Schleif- und Poliermaschine (Planopol-V 401, Struers A/S, Rodovre, Dänemark) auf eine Dicke von ungefähr 40 µm geschliffen und danach einer Oberflächenfärbung mit Toluidin-Blau unterzogen. Von den vier Dünnschnitten wurde ein Schnitt mit Toluidin-Blau und ein Schnitt mit van Kossa/McNeal - Tetrachrom-Färbung gefärbt. Die restlichen zwei dienten als Reserve.

### **3.6.2 Untersuchungsmethoden**

Sämtliche gefärbten Schnittpräparate wurden mit einem Lichtmikroskop (Leica® DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Deutschland) untersucht. Die Auswertung und Beurteilung der Schnitte erfolgte nach einem vorgegebenen Schema.

### **3.6.3 Probenauswertung**

Die Evaluierung der histologischen Schnitte erfolgte qualitativ und semiquantitativ:

1. Makroskopische und mikroskopische Beurteilung der Dickschnitte. Hierbei wurde besonders auf die Scaffold-Knochen-Verbindung geachtet.
2. Mikroskopische Beurteilung der Dünnschnitte. Scoring-System siehe (*Tab. 2*). Wenn sich bei der Beurteilung der Untersuchenden (LU,TA) verschiedene Werte ergaben, wurde der Mittelwert angegeben. Für die semiquantitative Auswertung wurden Schnitte beider Färbungen verwendet.
3. Statistische Untersuchung. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mithilfe eines Computerprogramms (SPSS, Version 11.0, MacIntosh) analysiert. Unterschiede aller Gruppen wurden mittels einer faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), spezifische Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden anhand eines post hoc Scheffè-Tests errechnet. Als signifikant wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  festgesetzt.

Auf eine quantitative Evaluierung in Form einer histomorphometrischen Messung wurde verzichtet, da der Anteil an neugebildetem Knochen als zu gering bemessen wurde und weil es in dieser Studie vor allem um die zellulären Reaktionen auf die verschiedenen Herstellungsverfahren der Seiden-Scaffolds ging.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Operation**

Bei allen drei Schafen konnte die Operation wie geplant durchgeführt werden. Die Anästhesie wurde von allen Tieren komplikationslos überstanden. Das Einsetzen der Scaffolds in den Bohrloch-Defekt verlief zumeist problemlos. Die Paraffin/UPW Tufts-Scaffolds waren beim Öffnen der Aluminium-Folien-Verpackung zerbrochen, was auf ihre bröckelige Konsistenz zurückzuführen ist. Aus diesem Grund konnten diese Scaffolds nicht in toto eingesetzt werden (*Abb. 6*). Dies hatte jedoch für die zelluläre Reaktion auf das Biomaterial keine nennenswerten Folgen und wurde deswegen in der weiteren Auswertung als Faktor vernachlässigt.

### **4.2 Postoperative Phase**

In der postoperativen Phase kam es zu keinen schwerwiegenden Komplikationen. Deshalb konnten alle Schafe innerhalb des geplanten Zeitabstandes von 8 Wochen der Schlachtung zugeführt werden. Bei Schaf 3102 wurde nach 10 Tagen post operationem eine leichte fluktuierende Schwellung im Bereich vom distalen, rechten Femur festgestellt, von der auch eine leichte Lahmheit herrührte. Es wurde eine Behandlung mit Carprofen (Rimadyl®, Pfizer, Dr. E. Gräub AG; Bern, Schweiz) durchgeführt. Einmal täglich wurden 5 ml s.c. über einen Zeitraum von fünf Tagen verabreicht. Um evtl. Frakturen o.ä. auszuschließen, wurden zwei Röntgenbilder erstellt. Bei der Beurteilung dieser ergaben sich jedoch keine Auffälligkeiten.

### **4.3 Beschaffenheit / Handhabung der Scaffolds**

Das Tränken in NaCl bzw. Blut führte bei allen Scaffold-Gruppen zu einer Aufweichung, aus der eine Elastizität und Komprimierbarkeit der Scaffolds resultierte. Wie bereits erwähnt, gab es jedoch qualitative Unterschiede. Aufgrund ihrer Elastizität konnten die Scaffolds gut in die Defekte eingepasst werden.

### **4.4 Makroskopische Beurteilung**

Direkt nach der Schlachtung wurden die Knochen makroskopisch beurteilt. Die vier verschiedenen Scaffold-Gruppen boten in allen Implantationsgebieten ein einheitliches Bild (*Abb. 7*). Es gab keine Anzeichen einer Entzündung oder übermäßiger Bindegewebszubildung rund um den gesetzten Bohrloch-Defekt.

### **4.5 Mikroskopische Auswertung**

Von den insgesamt 24 Proben konnten nur 20 für die Auswertung herangezogen werden, da es bei 4 Proben zu Fehlern während der Gewinnung bzw. Herstellung kam und deswegen die Schnitte für die Histologie nicht auswertbar waren. Es handelte sich hierbei um je zwei Proben aus der HFIP Tufts-Gruppe bzw. Paraffin ETH-Gruppe.

#### Dickschnitte

Von den Dickschnitten wurden Übersichtsaufnahmen (Vergrößerung: 0.5 x 5.8) mithilfe einer Leica Kamera gemacht (*Abb. 8*). Die Grenzfläche zwischen Scaffold und angrenzendem Knochengewebe wurde betrachtet. Diese war in den einzelnen Schnitten unterschiedlich. Während in einigen Schnitten (*Abb. 9*) eine direkte

Scaffold-Knochen-Verbindung festgestellt wurde, war in anderen Präparaten ein bindegewebiger Saum dazwischengelagert. In keinem der Schnitte wurden die Scaffolds von einer bindegewebigen Kapsel umhüllt.

### Dünnschnitte

Die Auswertung der Dünnschnitte erfolgte jeweils in drei Bereichen: in der Peripherie, dem Mittelteil und dem Zentrum des Scaffolds (*Abb.10*). In der qualitativen Beurteilung zeigte sich bei allen vier Gruppen ein ähnliches Bild. Zellproliferationen waren in allen drei Bereichen der Scaffolds zu beobachten (*Abb.11*).

Die Poren waren zumeist, mit einer Ausnahme (Scaffold 3103 re hum prox / HFIP Tufts), mit Zellen gefüllt. Es stellte sich aber heraus, daß Zellproliferationen in der Peripherie wesentlich deutlicher waren verglichen zum Zentrum. Beispielsweise war das Auftreten der Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Osteoblasten und Inseln neugebildeten Knochens im Mittelteil und der Peripherie markanter als im Zentrum. Lymphozyten, Plasmazellen und Fremdkörperriesenzellen waren überall gegenwärtig (*Abb. 12 u. 13*). Im Großen und Ganzen waren sie jedoch nicht in größeren Ansammlungen, sondern eher als Einzelzellen vorzufinden.

Wie bereits bei den Dickschnitten angesprochen, war die Verbindung zwischen Knochen und Scaffold unterschiedlich ausgeprägt.

Die ursprüngliche Scaffold-Struktur konnte in allen Proben nach wie vor gut erkannt werden. Das einheitliche Erscheinungsbild der Scaffolds (in der Beurteilung als „Homogenität“ bezeichnet) war im zentralen Bereich jeweils noch ausgeprägt, wohingegen sich nach außen hin schon deutlichere Abbauprozesse zeigten und auch mehr Verbindungen zwischen Poren auftraten (*Abb. 14*).

Verantwortlich für diese Abbauprozesse schienen Makrophagen bzw. Fremdkörperriesenzellen zu sein. Inseln neugebildeten Knochens waren in allen Scaffold-Gruppen nachweisbar (*Abb. 15*), jedoch nur in sehr geringem Umfang, sodaß sich histomorphometrische Messungen (quantitative Evaluierung) nicht lohnten.

In der semiquantitativen Beurteilung nach einem speziellen Punktesystem (*Tab. 3*), konnten zwischen den einzelnen Scaffolds keine signifikanten Differenzen hinsichtlich der Zellreaktion und Knochenbildung gefunden werden. Makrophagen wurden vor allem in den Poren innerhalb des Gewebes, Fremdkörperriesenzellen

direkt an den Porenrändern der Scaffolds und in unmittelbarer Nähe zu Osteoblasten oder deren Vorläuferzellen gefunden (*Abb. 16 u. 17*).

In allen vier Scaffold-Gruppen konnte eine Resorption der Seidenmatrix im peripheren Bereich, Neubildung von Knochen und Zellproliferation von Mesenchymal- und Osteoblasten-Vorläuferzellen gezeigt werden.

Anhand der Ergebnisse konnte der oben bereits erwähnte qualitative Eindruck bestätigt werden, daß zelluläre Infiltrationen im peripheren und mittleren Bereich der Scaffolds deutlicher ausgeprägt waren als im Zentrum.

Zu positiven Korrelationen zwischen allen Scaffolds kam es im Bezug auf Homogenität, lympho-plasmazelluläre Infiltration und Riesenfremdkörperzellen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Zellreaktionen und die Knochenneubildung und -abbau der verschiedenen Seiden-Scaffolds, ungeachtet des Herstellungsprozesses, ähnlich verliefen. Der Abbau der Scaffolds erfolgte vor allem durch Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen im biokompatiblen Rahmen und wurde nur von einer geringen Infiltration mit Entzündungszellen, wie Lymphozyten oder Plasmazellen, begleitet.

## **5 Diskussion**

In dieser Studie wurde gezeigt, daß Seiden-Scaffolds als Knochenersatz verwendet werden können und der Herstellungsprozess entweder mit Salzkristallen oder Paraffin als Porogen keinen Einfluß auf die Biokompatibilität im Knochen zur Folge hat. Ebenfalls spielte die Quelle, woher die Seidenproteine gewonnen wurden, keine Rolle in Bezug auf das Endergebnis.

### **5.1 Versuchsmodell**

Als Versuchstier wurde das Schaf gewählt. Es besitzt eine angenehme Größe, hat ein ruhiges Wesen und kann kostengünstig unter artgerechten Bedingungen gehalten werden. Erfahrungsgemäß belasten und bewegen operierte Schafe ihre Gliedmaßen mit diesem Tiermodell schnell wieder, sodaß auch von einer geringen Belastung der Tiere durch Schmerzen ausgegangen werden kann.

Zwar werden vor allem aus ethischen, aber auch finanziellen Gründen nach Möglichkeit kleine Versuchstiere wie Mäuse, Ratten oder Kaninchen bevorzugt eingesetzt [27], jedoch ergeben sich dabei Limitationen bezüglich der Größe der Tiere. Dies führt wiederum zu einem größeren Bedarf an Versuchstieren. Außerdem ist der Knochenmetabolismus dieser Tiere nicht mit dem des Menschen vergleichbar, was wiederum die Notwendigkeit weiterer Tests an phylogenetisch höher stehenden Tieren nach sich zieht.

Für die vorliegende Studie wurden ausschließlich Schafe im Alter von zwei Jahren verwendet, um dem Testmodell für Knochenersatzmaterialien gerecht zu werden. Hierzu gehört u.a. auch die Durchführung an adulten und phylogenetisch hochstehenden Tieren, die der Knochenphysiologie und dem Gewicht des Menschen vergleichbar sind [26].

Das Bohrlochmodell wurde aus drei Gründen gewählt:



a) aus Tierschutzgründen sollte ein Minimum an Schafen verwendet werden und trotzdem mußte man ausreichende Daten für eine statistische Auswertung erhalten. Die erzielten Ergebnisse können zudem leicht auf den Menschen übertragen werden [27].

b) Die Defektlokalisierung und der standardisierte, direkte Zugang stellt für die Tiere lediglich eine geringe Belastung dar. Die Tiere wurden hierzu, wie zuvor eingehend beschrieben, bilateral proximal und distal an Humerus und Femur operiert.

Als Knackpunkt erwies sich die präoperative korrekte Lagerung der Gliedmaßen, denn nur so konnte eine optimale Platzierung des Bohrlochs gewährleistet werden. Besonders an den Kondylen des distalen Humerus war dies von Bedeutung, da der Bohrer hier bei einer leichten Abweichung schnell abrutschen konnte und so evtl. das Ellenbogengelenk hätte verletzen können.

Allerdings wurden diese Komplikationen vermieden, was nicht zuletzt mit der chirurgischen Erfahrung der Operateure zutun hatte.

Das beschriebene Problem läßt sich zum jetzigen Zeitpunkt schwer beheben, da der Einsatz einer Bohrschablone an den beschriebenen Lokalisationen durch die umliegenden Strukturen nicht möglich ist.

c) Inter- wie auch intra-individuelle Unterschiede, als auch Unterschiede in der Lokalisation, können von bis zu acht unterschiedlichen Materialien ermöglicht und berücksichtigt werden. Die erfolgreiche Anwendung dieses Modells wurde bereits mehrfach beschrieben [28, 29, 73].

Es wurde darauf verzichtet, nicht gefüllte Kontrolldefekte zu setzen, weil dies eine höhere Anzahl von Versuchstieren bedingt hätte, da sonst für die statistische Auswertung zu wenig Proben zu Verfügung ständen. Ebenfalls war von früheren Versuchen in unserem Labor bekannt, daß Leerkontrollen sich innerhalb dieser Zeitspanne lediglich mit fibrösem Bindegewebe füllen (Vorversuche, nicht publizierte Daten).

Hinweise auf die Ursache der genannten Lahmheit und Weichteilschwellung bei Schaf 3102 fanden sich weder während der Operation, noch bei Untersuchungen nach der Schlachtung. Vielmehr schien es sich um ein normales Wundserom zu handeln, welches von selbst wieder und ohne negative Folgen resorbiert wurde.

Um die Eignung eines Biomaterials, eine bestimmte Funktion im Patienten zu erfüllen, zu testen, kann nicht nur auf *in vitro* - Tests zurückgegriffen werden.

Die Biokompatibilität und Knochenwachstumsförderung eines implantierbaren orthopädischen Materials sollte zudem noch in *in vivo* - Tests bestätigt werden [74].

## **5.2 Probenaufbereitung und –auswertung**

Die postmortal angefertigten Röntgenbilder sollten die Lokalisation der Defekte besser ersichtlich machen und zur Ermittlung des Verhaltens der Implantate im Knochen dienen. Allerdings waren die radiologischen Strukturen, welche bei den mit Seiden-Scaffolds gefüllten Defekten sichtbar waren, nicht immer aussagekräftig genug, um einer korrekten Lokalisierung zu dienen. Unter anderem deswegen, weil die Scaffolds für Röntgenstrahlen durchlässig sind.

Die mit den Scaffolds versehenen Knochenstücke wurden mithilfe einer Bandsäge jeweils aus Humerus und Femur herausgeschnitten. Auf diese Weise konnten alle Seiden-Scaffolds mitsamt dem umgebenden Knochen in einer Quaderform aus den Knochenstücken gewonnen werden.

Im Nachhinein stellte sich jedoch heraus, daß in 4 Fällen die Quader den Defekt trotz Zuhilfenahme der Röntgenbilder nicht oder nur teilweise enthielten. Folglich konnten nur 20 der ursprünglich 24 Proben für die Auswertung herangezogen werden.

Bei der Anfertigung der histologischen Dünn- und Dickschnitte gab es keine Probleme. Für die Dickschnitte wurde eine Oberflächenfärbung mit Toluidin-Blau gewählt. Diese Färbung läßt mononukleäre Zellen besser erkennen.

Die Dünnschnitte wurden sowohl mit Toluidin-Blau als auch mit van Kossa/Mc Neal gefärbt. Die van Kossa - Färbung stellt mineralisierten Knochen schwarz dar, während die Mc Neal-Tetrachrom - Gegenfärbung die unreife Knochenvorstufe, das unmineralisierte Osteoid, wie auch die Zellen türkisfarben erscheinen läßt.

### 5.3 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie sollte in einem ersten Schritt die Biokompatibilität von vier unterschiedlichen Seiden-Scaffold-Typen anhand der zellulären Reaktionen, in acht unterschiedlichen Lokalisationen am Schaf über einen Zeitraum von 8 Wochen untersucht werden.

Es zeigte sich, daß alle Scaffold-Typen gut verträglich waren und keine über das übliche Maß hinaus auftretende Fremdkörperreaktion ausgelöst wurde. Im Vergleich zueinander konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen Herstellungsprotokollen und Seidenherkunft beobachtet werden.

Es wurde vorher noch kein Tierversuch zu dieser Fragestellung durchgeführt, in dem mit den zu vergleichenden Scaffold-Typen und dem gewählten Tiermodell gearbeitet wurde. Andere Aussagen, beispielsweise über die mechanische Belastbarkeit der Scaffolds, sollten mit dieser Studie nicht gemacht werden. Deshalb genügte das verwendete Tiermodell auch den Ansprüchen.

Die makroskopische Untersuchung nach der Schlachtung lieferte keine Anzeichen für eine unzureichende Biokompatibilität, wie eine bindegewebige Abkapselung oder entzündliche Hyperämie.

Das gleiche Bild zeigte sich auch bei Schaf 3102, weshalb die Frage nach dem Grund für die postoperative Schwellung und Lahmheit nicht endgültig geklärt werden konnte.

Die radiologische Untersuchung nach der Schlachtung wurde nicht zur Bewertung herangezogen, da die Menge eingewachsenen bzw. neugebildeten Knochens zu gering war, als daß sie eine Aussagekraft gehabt hätte.

Bei der Bewertung der Dickschnitte wurde auf die Verbindung von Seiden-Scaffold und umgebenden Knochen geachtet. Dabei zeigten sich zwar Unterschiede in der Ausprägung dieser Übergangszone, aber in keiner der Proben kann man von einer bindegewebigen Kapsel sprechen. Die Scaffold-Gruppe spielte hierbei aber keine Rolle. Vielmehr muß davon ausgegangen werden, daß die Individualität eines jeden Bohrlochs hierfür verantwortlich zu sein scheint, vermutlich in Verbindung mit Mikrobewegungen.

Die schon in anderen Studien beschriebene Eigenschaft der „langsamen Degradation“ von Seide [75], bestätigte sich auch in der histologischen

Untersuchung. Die Seiden-Scaffolds bewahrten weitgehendst ihre anfängliche Morphologie und boten eine stabile Grundlage für das Knochenwachstum.

D.h. sie stellten keine Grenze für einwachsendes Gewebe dar. Es gab allerdings Unterschiede in der Intensität von Zellproliferation und dem Auftreten von Knocheninseln. Bei allen Scaffolds schienen diese in Peripherie und Mittelteil ausgeprägter zu sein als im Zentrum.

Die multinukleären Riesenzellen, welche ja als das kennzeichnende Merkmal einer Fremdkörperreaktion auf implantierte Materialien gelten [76], waren zwar in allen Scaffolds gegenwärtig, jedoch nicht in „Anhäufungen“ und vor allem nicht in Begleitung von anderen Entzündungszellen (Lymphozyten und Plasmazellen).

Der Abbau der Seide erfolgte durch zelluläre Prozesse, in diesem Falle durch Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen, was vor allem in Hinblick auf Makrophagen bei degradierbaren Biomaterialien im Knochen sehr häufig beobachtet wird [24, 28, 60].

Solange dieser Abbau nicht von einer massiven Entzündungsreaktion, charakterisiert durch gleichzeitige Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen, sowie einer fibrösen Abkapselung des Materials begleitet wird, kann trotzdem von einer biokompatiblen Reaktion des Gewebes gesprochen werden.

Bei den getesteten Seiden-Scaffolds wurden keine solchen massiven Entzündungsreaktionen beobachtet und zusätzlich waren die Fremdkörperriesenzellen in direkter Nachbarschaft zu Osteoblasten und deren Vorläuferzellen zu beobachten.

Während das Erscheinen von Makrophagen beim Abbau von degradierbaren Materialien im Knochen bereits als physiologisch eingestuft werden kann [24, 59, 60], ist diese Einteilung bei Fremdkörperriesenzellen in diesem Zusammenhang noch etwas unklar.

Studien in unserem Labor deuten darauf hin, daß solange die Fremdkörperriesenzellen alleine und in direktem Kontakt zu Osteoblasten und deren Vorläuferzellen auftreten, ebenfalls von einem physiologischen, nicht-entzündlichen Materialabbau ausgegangen werden kann (Dr. Katja Nuss, Publikation in Vorbereitung).

Deshalb wurde die Fremdkörperreaktion bei den getesteten Scaffolds als im Rahmen der zu erwartenden Degradation von Biomaterialien durch Zellen eingestuft. Alle

Biomaterialien aus nicht-autologer Quelle werden eine bestimmte Art von Fremdkörperreaktion hervorrufen [38].

So auch Seidenfibroin, allerdings ist die Reaktion vergleichbar mit den meisten heutzutage gebräuchlichen synthetischen Materialien und ist auch abhängig von Implantationsort und Versuchsmodell.

Es gab keine signifikanten Unterschiede bei den bewerteten Zellen bezüglich Herstellungsprotokoll und Seidenherkunft. Ebenso wurden keine signifikanten Unterschiede in der Intensität der Knochenneubildung beobachtet, wobei betont werden muß, daß die Menge der Knocheninseln als zu gering bewertet wurde, um eine histomorphometrische Untersuchung durchzuführen.

Unterschiede in der Knochenneubildung wurden allerdings auch nicht erwartet, da die Seide in dieser Studie lediglich zur Eignung als Scaffold, also letztlich zur Osteokonduktivität, getestet werden sollte.

Diese Scaffolds sollten erst nach diesem Biokompatibilitätstest mit weiteren, osteoinduktiven Substanzen versehen werden, welche allerdings erst Gegenstand von Nachfolgeuntersuchungen sein können.

Die Anwendbarkeit von Seiden-Scaffolds konnte anhand dieser Studie aufgezeigt werden.

Die Biokompatibilität von Seidenfibroin wurde bereits in zahlreichen Studien belegt [13, 38, 40, 43-45, 77] und konnte auch in der vorliegenden Studie aufgezeigt werden.

Keine der Scaffold-Gruppen hatte gegenüber den anderen signifikante Vorteile aufzuweisen. Der Knochen reagierte nicht signifikant unterschiedlich auf die Herstellungsprotokolle oder Seidenquelle.

Weshalb die Scaffolds der Gruppe UPW Tufts gebrochen waren und deshalb nicht in toto eingesetzt werden konnten, konnte nicht geklärt werden. Ob es als Zufall zu bewerten ist oder mit dem Herstellungsprotokoll in Zusammenhang steht, bleibt offen.

## 5.4 Perspektiven

Es ist davon auszugehen, daß die lokale Reaktion bzw. Fremdkörperreaktion kontrolliert werden kann, wenn der gesamte Herstellungsprozess standardisiert ist, weshalb die Ergebnisse dieser Studie die untersuchten Seiden-Scaffolds als grundsätzlich geeignet erscheinen lassen.

Die genannten Vorteile wie langsame Degradation oder Modifizierbarkeit mechanischer Eigenschaften etc. sprechen für sich.

Durch welche Maßnahmen beispielsweise die Knochenneubildungsrate (osteoinduktive Wachstumsfaktoren, Scaffold-Morphologie etc.) durch Dekoration der Seiden-Scaffolds mit dafür geeigneten Molekülen erhöht werden kann, ist bereits Gegenstand von weiteren Studien.

In dieser Kombination darf auch eine beschleunigte Knochenwachstumsrate erwartet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Sailer, H.F. and F.E. Weber, [*Bone substitutes*]. Mund Kiefer Gesichtschir, 2000. **4 Suppl 1**: p. S384-91.
2. Albrektsson, T., *In vivo studies of bone grafts. The possibility of vascular anastomoses in healing bone*. Acta Orthop Scand, 1980. **51**(1): p. 9-17.
3. Behrens, P., E. Wolf, and J. Bruns, [*In vitro culture of human autologous osteoblast cells on natural bone mineral*]. Orthopade, 2000. **29**(2): p. 129-34.
4. Schmitt, S., *Besiedlung verschiedener Biomaterialien mit Osteoblasten aus dem Unterkiefer von Schafen*, in *Med. Fakultät 2006*, Uniklinik Freiburg: Freiburg.
5. Rueger, J.M., [*Bone substitution materials. Current status and prospects*]. Orthopade, 1998. **27**(2): p. 72-9.
6. Zhang, R. and P.X. Ma, *Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology*. J Biomed Mater Res, 1999. **44**(4): p. 446-55.
7. Burg, K.J., S. Porter, and J.F. Kellam, *Biomaterial developments for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2347-59.
8. Bauer, T.W. and G.F. Muschler, *Bone graft materials. An overview of the basic science*. Clin Orthop Relat Res, 2000(371): p. 10-27.
9. Spiekermann, H., *Implantologie*. 1994, Stuttgart: Thieme.
10. Lange, F., *Über die Sehnenplastik*. Verl Dtsch Orthop Ges, 1903. **2**: p. 10-12.
11. Lange, F., *Künstliche Bänder aus Seide*. Münch Med Wochenschr, 1907. **17**: p. 834-836.
12. Hofmann, S., et al., *Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds*. Biomaterials, 2007. **28**(6): p. 1152-62.
13. Meinel, L., et al., *Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds*. J Biomed Mater Res A, 2004. **71**(1): p. 25-34.
14. Davidson, M.K., J.R. Lindsey, and J.K. Davis, *Requirements and selection of an animal model*. Isr J Med Sci, 1987. **23**(6): p. 551-5.
15. Benghuzzi, H., *Cytological evaluation of capsular tissue surrounding TCPL implant in adult rats*. Biomed Sci Instrum, 1996. **32**: p. 81-6.
16. Butler, K., et al., *One year histopathological evaluation of fibrous tissue surrounding TCPL implants using adult rats as a model*. Biomed Sci Instrum, 1997. **33**: p. 233-9.
17. Held, M., et al., *Biocompatibility testing of new polymers in a moving implant bed*. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2000. **62**(5): p. 247-50.
18. Gao, J., et al., *Osteochondral defect repair by demineralized cortical bone matrix*. Clin Orthop Relat Res, 2004(427 Suppl): p. S62-6.
19. Bumgardner, J.D., et al., *Preliminary evaluation of a new dental implant design in canine models*. Implant Dent, 2000. **9**(3): p. 252-60.
20. Choueka, J., et al., *Canine bone response to tyrosine-derived polycarbonates and poly(L-lactic acid)*. J Biomed Mater Res, 1996. **31**(1): p. 35-41.

21. Bush, D., et al., *The effect of TCPL devices on tissue-implant interface analysis using adult sheep as a model*. Biomed Sci Instrum, 1995. **31**: p. 147-52.
22. Fini, M., et al., *Biocompatibility and osseointegration in osteoporotic bone*. J Bone Joint Surg Br, 2001. **83**(1): p. 139-43.
23. Ignatius, A.A., et al., *In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes*. J Biomed Mater Res, 2001. **58**(6): p. 701-9.
24. Kuemmerle, J.M., et al., *Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep*. J Craniomaxillofac Surg, 2005. **33**(1): p. 37-44.
25. Augat, P., et al., *Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap*. J Orthop Res, 1998. **16**(4): p. 475-81.
26. Nunamaker, D.M., *Experimental models of fracture repair*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S56-65.
27. Nuss, K.M., et al., *An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones*. BMC Musculoskelet Disord, 2006. **7**: p. 67.
28. Oberle, A., et al., *[Investigation about the clinical use of brushite- and hydroxylapatite-cement in sheep]*. Schweiz Arch Tierheilkd, 2005. **147**(11): p. 482-90.
29. Apelt, D., et al., *In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements*. Biomaterials, 2004. **25**(7-8): p. 1439-51.
30. Weihe, S. and M. Epple, *Vom Fremdkörper zum biologisch aktivem Implantat*. 2001, Rubin Wissenschaftsmagazin der Ruhr-Universität Bochum.
31. Schildhauer, T.A., C.J. Gekle, and G. Muhr, *[Biomaterials in the skeletal system]*. Chirurg, 1999. **70**(8): p. 888-96.
32. Gazdag, A.R., et al., *Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications*. J Am Acad Orthop Surg, 1995. **3**(1): p. 1-8.
33. Garg, M., et al., *Early biologic behavior of bone grafts. A fine needle aspiration cytology study*. Acta Cytol, 1997. **41**(3): p. 765-70.
34. Kurz, L.T., S.R. Garfin, and R.E. Booth, Jr., *Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques*. Spine, 1989. **14**(12): p. 1324-31.
35. Damien, C.J. and J.R. Parsons, *Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications*. J Appl Biomater, 1991. **2**(3): p. 187-208.
36. Gerngross, H., et al., *[Complications at removal sites of autologous cancellous bone transplants]*. Aktuelle Traumatol, 1982. **12**(3): p. 146-52.
37. Cassidy, C., et al., *Norian SRS cement compared with conventional fixation in distal radial fractures. A randomized study*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A**(11): p. 2127-37.
38. Altman, G.H., et al., *Silk-based biomaterials*. Biomaterials, 2003. **24**(3): p. 401-16.
39. Meinel, L., et al., *Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow*. Ann Biomed Eng, 2004. **32**(1): p. 112-22.
40. Sofia, S., et al., *Functionalized silk-based biomaterials for bone formation*. J Biomed Mater Res, 2001. **54**(1): p. 139-48.



41. Zaoming, W., et al., *Partial characterization of the silk allergens in mulberry silk extract*. J Invest Allergol Clin Immunol, 1996. **6**(4): p. 237-41.
42. Dewair, M., X. Baur, and K. Ziegler, *Use of immunoblot technique for detection of human IgE and IgG antibodies to individual silk proteins*. J Allergy Clin Immunol, 1985. **76**(4): p. 537-42.
43. Santin, M., et al., *In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin*. J Biomed Mater Res, 1999. **46**(3): p. 382-9.
44. Panilaitis, B., et al., *Macrophage responses to silk*. Biomaterials, 2003. **24**(18): p. 3079-85.
45. Meinel, L., et al., *The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo*. Biomaterials, 2005. **26**(2): p. 147-55.
46. McGrath, K. and D. Kaplan, *Protein-based Materials*. 1998, Boston: Birkhauser.
47. Fini, M., et al., *The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel*. Biomaterials, 2005. **26**(17): p. 3527-36.
48. Gobin, A.S., et al., *Silk-fibroin-coated liposomes for long-term and targeted drug delivery*. Int J Nanomedicine, 2006. **1**(1): p. 81-7.
49. Williams, D.F., *Definitions in Biomaterials*. 1987, Amsterdam: Elsevier.
50. Campbell, C.E. and A.F. von Recum, *Microtopography and soft tissue response*. J Invest Surg, 1989. **2**(1): p. 51-74.
51. Boss, J.H., et al., *The relativity of biocompatibility. A critique of the concept of biocompatibility*. Isr J Med Sci, 1995. **31**(4): p. 203-9.
52. Ikarashi, Y., et al., *Comparative studies by cell culture and in vivo implantation test on the toxicity of natural rubber latex materials*. J Biomed Mater Res, 1992. **26**(3): p. 339-56.
53. Ignatius, A.A. and L.E. Claes, *In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide)*. Biomaterials, 1996. **17**(8): p. 831-9.
54. Spector, M., *The local response to biomaterials. Critical Reviews in Biocompatibility*. 1989. **5**: p. 269-295.
55. Anderson, J.M., *Inflammation, wound healing, and the foreign body response*. Academic Press, 1996: p. 165-172.
56. Klinge, U., et al., *Foreign body reaction to meshes used for the repair of abdominal wall hernias*. Eur J Surg, 1999. **165**(7): p. 665-73.
57. Anderson, J.M., *Inflammatory response to implants*. ASAIO Trans, 1988. **34**(2): p. 101-7.
58. Morehead, J.M. and G.R. Holt, *Soft-tissue response to synthetic biomaterials*. Otolaryngol Clin North Am, 1994. **27**(1): p. 195-201.
59. Theiss, F., et al., *Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement*. Biomaterials, 2005. **26**(21): p. 4383-94.
60. Lassus, J., et al., *Macrophage activation results in bone resorption*. Clin Orthop Relat Res, 1998(352): p. 7-15.
61. DeFife, K.M., et al., *Disruption of filamentous actin inhibits human macrophage fusion*. Faseb J, 1999. **13**(8): p. 823-32.
62. Hochuli-Vieira, E., et al., *Rigid internal fixation with titanium versus bioresorbable miniplates in the repair of mandibular fractures in rabbits*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2005. **34**(2): p. 167-73.

63. Frayssinet, P., et al., *Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement*. Biomaterials, 1998. **19**(11-12): p. 971-7.
64. Dersot, J.M., et al., *Multinucleated giant cells elicited around hydroxyapatite particles implanted in craniotomy defects are not osteoclasts*. Anat Rec, 1995. **242**(2): p. 166-76.
65. Holmbom, J., et al., *Long-term evaluation of porous poly(epsilon-caprolactone-co-L-lactide) as a bone-filling material*. J Biomed Mater Res A, 2005. **75**(2): p. 308-15.
66. Klein, C.P., et al., *Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue*. J Biomed Mater Res, 1983. **17**(5): p. 769-84.
67. Klein, C.P., et al., *A comparative study of different beta-whitlockite ceramics in rabbit cortical bone with regard to their biodegradation behaviour*. Biomaterials, 1986. **7**(2): p. 144-6.
68. Coleman, D.L., R.N. King, and J.D. Andrade, *The foreign body reaction: a chronic inflammatory response*. J Biomed Mater Res, 1974. **8**(5): p. 199-211.
69. Smetana, K., Jr., *Multinucleate foreign-body giant cell formation*. Exp Mol Pathol, 1987. **46**(3): p. 258-65.
70. Papadimitriou, J.M., D. Sforsina, and L. Papaelias, *Kinetics of multinucleate giant cell formation and their modification by various agents in foreign body reactions*. Am J Pathol, 1973. **73**(2): p. 349-64.
71. Jenney, C.R. and J.M. Anderson, *Effects of surface-coupled polyethylene oxide on human macrophage adhesion and foreign body giant cell formation in vitro*. J Biomed Mater Res, 1999. **44**(2): p. 206-16.
72. Stokes, K., R. McVenes, and J.M. Anderson, *Polyurethane elastomer biostability*. J Biomater Appl, 1995. **9**(4): p. 321-54.
73. Génot, O.R., *Evaluation von vier biodegradierbaren, injizierbaren Knochenzementen in einer experimentellen Studie an Schafen*, in *MSRU*. 2006, Vetsuisse-Fakultät Zurich. p. 69.
74. Fini, M. and R. Giardino, *In vitro and vivo tests for the biological evaluation of candidate orthopaedic materials benefits and limits*. J Appl Biomater Biomech, 2003. **1**: p. 155-163.
75. Uebersax, L., et al., *Effect of scaffold design on bone morphology in vitro*. Tissue Eng, 2006. **12**(12): p. 3417-29.
76. Anderson, J.M., *Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices*. Cardiovasc Pathol, 1993. **2**: p. 33-41.
77. Kim, K.H., et al., *Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration*. J Biotechnol, 2005. **120**(3): p. 327-39.